



TITLE:

On-chip Electrophoretic Fractionation of  
Cytoplasmic and Nuclear RNA from Single  
Cells( Abstract\_要旨 )

AUTHOR(S):

MAHMOUD, NADY ABDELMOEZ ATTA

---

CITATION:

MAHMOUD, NADY ABDELMOEZ ATTA. On-chip Electrophoretic Fractionation of  
Cytoplasmic and Nuclear RNA from Single Cells. 京都大学, 2019, 博士(工学)

ISSUE DATE:

2019-09-24

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k22065>

RIGHT:

許諾条件により本文は2020-04-01に公開

京都大学	博士（工学）	氏名	MAHMOUD NADY ABDELMOEZ ATTA
論文題目	On-chip Electrophoretic Fractionation of Cytoplasmic and Nuclear RNA from Single Cells (オンチップ電気泳動を用いた 1 細胞の細胞質 RNA および核 RNA の分画)		
<p>（論文内容の要旨）</p> <p>本論文は、1 細胞の細胞質 RNA と核 RNA をマイクロ流体デバイスで高精度に分画、それらの RNA 発現を独立かつ並列で解析する SINC-seq 法(single cell integrated nuclear and cytoplasmic RNA-sequencing)を提案し、細胞質-核間に存在する RNA 発現の相関性を 1 細胞レベルの分解能で明らかにしたものであり、5 章から構成されている。</p> <p>第 1 章は序論であり、研究の背景および目的、提案する研究手法および論文全体の構成について述べている。まず、電気泳動を用いた 1 細胞解析について概説すると共に、当該分野におけるマイクロ流体技術の貢献について言及している。また、1 細胞の DNA および RNA といった複数種の分子を対象にした解析手法、すなわちマルチオミックス解析に関する研究動向について議論し、電気泳動解析と次世代シーケンサーを組み合わせた新しい解析手法の必要性について指摘している。第 1 章の最後に、本研究で開発した SINC-seq 法について言及し、第 2 章から第 4 章で述べている具体的な研究内容について概説、論文全体の構成について述べている。</p> <p>第 2 章では、本研究で開発したマイクロ流体システムの設計に関して議論している。マイクロ流体システムは T 字路構造であり、3 つの流路端はそれぞれ直径 4 mm の液貯めに接続している。流路幅は 50 <math>\mu\text{m}</math> および流路深さは 25 <math>\mu\text{m}</math>、流路の長さはそれぞれ 1、10、および 25 mm である。T 字路の合流部分近傍には細胞および細胞核を捕捉する流体トラップを有している。流体トラップ部分の流路幅は 3 <math>\mu\text{m}</math> であり、外部電場印加時に細胞膜に生じる膜電位と分子透過性の上昇に関する数値解析結果を基に決定した。本マイクロ流路形状はネガ型厚膜フォトレジスト SU-8(MicroChem)を用いたフォトリソグラフィ法および PDMS (polydimethylsiloxane)を用いた成型により作製し、最後に大気プラズマ処理により PDMS とガラス基板を接合した。</p> <p>開発したマイクロ流体システムをヒト慢性白血病細胞である K562 細胞を用いて評価した。マイクロ流体システムは、流体トラップ部分においてイオン電流の経路を限定することで集中電場を発生し、電気穿孔による効率的かつ選択的な細胞膜の破碎を可能にした。この方法により従来法のおよそ 1/20 の印加電圧で細胞膜の破碎を達成した。これに続く等速電気泳動により 1 細胞の細胞質 RNA と核 RNA を分画した。さらに、それぞれの分画に含まれる RNA が検出可能であることを示すため、ハウスキーピング遺伝子である <i>GAPDH</i> (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) を対象に、逆転写定量ポリメラーゼ連鎖反応を行い、それぞれに分画された RNA が計測可能であることを示した。また、溶液中に浮遊する非 1 細胞由来の RNA 分子は 1 細胞解析において問題になるため、浮遊 RNA 分子を定量し、その含有率は最大でも計測対象のおよそ 5%以下であることを示した。</p> <p>第 3 章では、電場を用いた細胞膜の破碎および細胞質 RNA の抽出過程における RNA の輸送現象を数値解析および実験により考察している。開発したマイクロ流体システムにおける細胞質 RNA の抽出では RNA の電気泳動が支配的であり、この結果、RNA 分子の長さに依存しない均一な抽出を実現できることを示した。具体的には、RNA と特異的に結合する蛍光分子で K562 細胞の RNA 分子を染色し、細胞質 RNA の抽出過程を蛍光顕微鏡により観察した。本観察は、ミトコンドリアと会合した RNA 分子(ミトコンドリア RNA)および細胞質中に浮遊した RNA 分子では流動性が異なることを示し、抽出に要する特徴時間がそれぞれ 3.8 s および 0.15 s であることを明らかにした。特に前者のミトコンドリア RNA は細胞質に局在するミトコンドリアで転写された後も細胞質内に留まると考えられることから、各分画におけるミトコンドリア RNA の検出量を比較することで細胞質 RNA と核 RNA の分画精度を定量する方法を提案した。また、計測した特徴時間から 40 s 間の電気泳動でミトコンドリア RNA のおよそ 98.9%を抽出できることを示した。</p> <p>次に抽出における RNA 分子の鎖長依存性に関して有限要素法解析で考察した。本解析では、細胞膜の破碎および細胞質 RNA 分子の輸送がそれぞれ異なる特徴時間(<math>10^{-6}\text{s}</math> および <math>10^0\text{s}</math> の時間スケール)</p>			

京都大学	博士（工学）	氏名	MAHMOUD NADY ABDELMOEZ ATTA
<p>で生じる現象であることから、これらを独立した二段階の物理現象として取り扱い、前者の現象に関する数値解析から得られる細胞膜の分子透過性を後者の境界条件として課す一方向の連成解析を行った。ここでは、細胞膜の分子透過性を asymptotic Smoluchowski 方程式、RNA 分子の輸送を Nernst-Planck 方程式によりモデル化した。本解析により、RNA 分子の鎖長に応じた流動特性の違いが、拡散係数と電気泳動移動度により特徴付けられた。一般に拡散係数は RNA 分子の鎖長増加に対して減少し、自由溶媒中においては Stokes-Einstein 式により記述される。ただし、細胞質内は分子が混み合った状態と考えられ、自由溶媒中よりも RNA 分子の拡散係数が低下することが示唆されている。そこで本解析では、Stokes-Einstein 式による拡散係数の予測値および文献値の両者を包含する <math>10^{-14}</math> から <math>10^{-11}</math> <math>\text{m}^2/\text{s}</math> の範囲で拡散係数の影響を考察した。一方、電気泳動移動度は RNA 分子の鎖長にほぼ依存しないことから、蛍光染色した RNA ラダー分子 (0.2-10 knt) および K562 細胞のトータル RNA で計測した値を用いた。数値解析結果と実験結果の比較から、構築した数値解析モデルが細胞質内の浮遊 RNA 分子の輸送を再現することを示した。また、抽出の特徴時間は RNA 分子の拡散係数にほぼ依存せず、マイクロ流体システムが RNA 分子の鎖長にほぼ依存しない抽出を提供することを示した。</p> <p>一方、数値解析結果は、拡散係数が比較的大きい <math>10^{-12}</math> から <math>10^{-11}</math> <math>\text{m}^2/\text{s}</math> の条件において、抽出に要する時間がわずかに上昇する興味深い傾向を示した。そこで、抽出時間を 1 s に短縮した条件と 40 s とした条件で実験を行い、得られた細胞質分画および核分画をそれぞれ RNA シーケンシングで解析し、RNA 分子の鎖長分布を比較したところ、1 s に抽出時間を短縮した条件で得られた核分画において比較的短い (100-600 nt) RNA 分子が増加していることが分かった。この実験結果は、前述の数値解析結果を支持しており、拡散係数の大きい、すなわち短い RNA 分子の方が抽出に時間を要することが明らかになった。</p> <p>第 4 章では 1 細胞の細胞質 RNA と核 RNA をそれぞれ独立に定量する SINC-seq 法の性能指標として遺伝子検出感度、分画精度等の評価をし、かつ、生命現象への具体的な適用例を示している。SINC-seq 法では主に poly(A) 鎖を有する RNA 分子を対象として解析を実施した。検出遺伝子数は細胞質分画で多く、細胞質と核分画の総検出遺伝子数は、通常の 1 細胞 RNA シーケンシング解析（従来方法）で得られる量と比較して 5% 程度低いことが分かった。一方で従来方法では計測ができない細胞質あるいは核における RNA 分子の局在を定量し、平衡状態において mRNA 分子のおよそ 84% が細胞質に存在することを示した。細胞質 RNA 発現と核 RNA 発現を統合して得た <i>in silico</i> 1 細胞 RNA 発現パターンは従来方法で計測した 1 細胞遺伝子発現パターンと高い相関性を示した。さらに、核 RNA 発現パターンは <i>in silico</i> 1 細胞 RNA 発現パターンと概ね整合することが確認され、このことから 1 細胞に単離が困難な場合に 1 細胞 RNA シーケンシング法の代用として用いられる 1 核 RNA シーケンシング法の妥当性を支持した。一方で、細胞質および核における RNA 発現の相関性を示さない遺伝子群や負の相関性を示す遺伝子群が存在することも発見し、1 核 RNA シーケンシング法の課題について言及した。</p> <p>SINC-seq 法の適用例として、mRNA のイントロン領域 (mRNA の成熟過程において除去される領域) の保持と細胞質-核における RNA 発現量の相関を解析し、イントロン領域の保持とそれに伴う核 RNA 発現量の上昇を示唆する遺伝子群を抽出し、さらにこれら遺伝子群が RNA メタボリズムおよびスプライシングに関連することを示唆した。また、別の適用例として K562 細胞の赤血球様細胞への分化を解析し、細胞のエピジェネティック状態の変化が、核 RNA 発現から細胞質 RNA 発現へ伝播する様子を捉えることに成功した。</p> <p>第 5 章は結論であり、研究成果とその意義について総括すると共に、今後の研究課題について述べている。</p>			

## (論文審査の結果の要旨)

本論文は、1細胞の細胞質 RNA と核 RNA をマイクロ流体デバイスで高精度に分画し、それらの RNA 発現を独立かつ並列で解析する SINC-seq 法(single cell integrated nuclear and cytoplasmic RNA-sequencing)を提案し、細胞質-核間に存在する RNA 発現の相関性を明らかにしたものである。得られた主な成果は次のとおりである。

1. 1細胞を捕捉する流体トラップを有する T字路構造のマイクロ流体システムを開発し、細胞質と核の高精度分画を可能にした。開発したシステムは、外部電場により生じるイオン電流を流体トラップ部分で集中させ、局所的に増大した電場を活用して細胞膜を効率的かつ選択的に破碎することが可能である。この方法により従来法のおよそ 1/20 の印加電圧で細胞膜の破碎を達成した。
2. 電気泳動を用いた細胞質 RNA の抽出を蛍光顕微鏡観察し、細胞質に浮遊した比較的自由的な RNA とミトコンドリア RNA で抽出時に示す流動特性が異なることを発見した。両者を比較すると後者のミトコンドリア RNA の抽出時間の方が比較的長く、3.8 s という特徴時間を示した。SINC-seq 法では 40 s の抽出時間を設けており、それにより約 98.9%のミトコンドリア RNA が抽出されることが予想された。また、ミトコンドリア RNA が細胞質で転写され、細胞質に留まるという性質を活用して、ミトコンドリア RNA の発現解析から細胞質 RNA-核 RNA の分画精度を評価する方法を提案した。
3. 電気泳動を用いた細胞質 RNA 抽出における RNA 分子鎖長が及ぼす影響について、数値解析および RNA シーケンシングにより考察し、開発したマイクロ流体システムが RNA 分子の鎖長に依存しない分画を達成することを示した。本システムの抽出過程における細胞質 RNA の輸送は電気泳動と拡散により影響を受けると考えられるが、拡散係数が  $10^{-14}$  から  $10^{-11}$   $\text{m}^2/\text{s}$  の範囲において、理論的考察から電気泳動が支配的であることが明らかになった。また、RNA の拡散係数は分子鎖長とともに減少する一方で電気泳動移動度はほぼ一定であるため、電気泳動が支配的な本システムは RNA 分子鎖長に依存しない抽出を達成することが分かった。さらに、数値解析結果から、拡散係数の大きな RNA 分子(およそ  $10^{-12}$ – $10^{-11}$   $\text{m}^2/\text{s}$  の範囲)において抽出時間がわずかに上昇する現象を発見し、これを考察する実験として抽出時間を 40 s から 1 s に短縮した条件を用いて RNA シーケンシングを実施し、数値解析結果を支持する結果を得た。
4. マイクロ流体システムを用いた 1細胞の細胞質 RNA と核 RNA の高精度分画、それら分画を用いた RNA シーケンシングを組み合わせた SINC-seq 法を提案した。SINC-seq 法を用いた解析結果から、RNA 分子の細胞質-核における局在、遺伝子発現パターンの相関解析、イントロン領域と RNA 局在の相関解析、K562 細胞の分化ダイナミクス解析を実現した。

以上のように、本論文は学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって本論文は博士(工学)の学位論文として価値あるものと認める。

また、令和元年 7 月 24 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行い、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。